

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN.

Over het gebrek „Knijpers" in Edammer kaas

DOOR

F. W. J. BOEKHOUT en J. J. OTT DE VRIES.

Dit gebrek bestaat in het voorkomen van één of meerdere groote spleten, welke het kaasdeeg doorklieven en als het ware in afzonderlijke deelen scheiden. In de ergste gevallen blijft gewoonlijk alleen de korst intact en houdt zij de massa bijeen, doch het komt soms voor, dat de korst plaatselijk openbarst door den gasdruk.

Het gebrek treedt op wanneer de kaas ongeveer 12 à 14 dagen oud is, en is te constateeren door het holle geluid, dat men bij het kloppen op de kaas hoort en het vormen van een ondiep gootje in de korst op de plaats, waar de spleet zich bevindt als deze tot de korst is doorgedrongen.

Wanneer een knijper onder water geopend wordt, door hem op de plek, waar de lichte verzakking zich in de korst bevindt, in te snijden, ziet men een vrij groot aantal bellen naar boven stijgen, zoodat dergelijke kazen eene belangrijke hoeveelheid gas herbergen. Teneinde de samenstelling er van te kunnen bepalen werd het gas, uit verschillende „knijpers" afkomstig, opgevangen en onderzocht. Het opvangen geschiedde op de volgende wijze:

In een bak, welke zoover met water gevuld was, dat een Edammer kaas daarin geheel ondergedompeld kon worden, werd, met de grootste opening naar beneden gekeerd, een wijde trechter geplaatst. De steel daarvan werd voorzien van een stukje caoutchouc buis, in welker eene uiteinde een smal toeloopend glazen buisje stak, dat dienen moest om eene verbinding met de Hempelsche gasburet tot stand te kunnen brengen. Nadat de trechter volgezogen was met water en de caoutchouc buis toegeknepen was door middel van een klemkraan, teneinde het zakken van de vloeistof te beletten, werd eene kaas in den bak gebracht, onder de trechteropening geschoven en ingesneden op de plaats der verdieping in de korst. De vrijkomende bellen stijgen dan omhoog en verzamelen zich in den trechter, vanwaar het gas in de gasburet kan worden overgezogen. Het dus verkregen gas word geanalyseerd volgens de bekende methode, waarbij de volgende resultaten werden verkregen:

2095305

Knijper No. 1.

Totale hoeveelheid gas	137,6 c.c.
na absorbtie in KOH	112,0 „
CO ₂	25,6 c.c.
1e genomen van het restant	20,4 c.c.
met lucht aangevuld	66,0 „
na explosie	46,4 „
verdwenen	19,6 c.c.
overeenkomende met H ₂	13,06 c.c.
2e genomen van het restant	28,8 c.c.
met lucht aangevuld	90,5 „
na explosie	62,6 „
verdwenen	27,9 c.c.
overeenkomende met H ₂	18,6 c.c.

Na explosie was geen CO₂ aanwezig, zoodat methan in het oorspronkelijk gas niet voorkomt.

Het gas bestond dus uit:

25,6 c.c.	CO ₂
72,0 „	H ₂
40,0 „	N ₂

Totaal . . . 137,6 c.c.

Knijper No. 2.

Totale hoeveelheid gas	249,0 c.c.
daarvan genomen	96,6 „
na absorbtie in KOH	75,6 „
CO ₂	21,0 c.c.
genomen van het restant	30,5 c.c.
met lucht aangevuld	91,2 „
na explosie	75,5 „
verdwenen	33,7 c.c.
overeenkomende met H ₂	22,5 c.c.

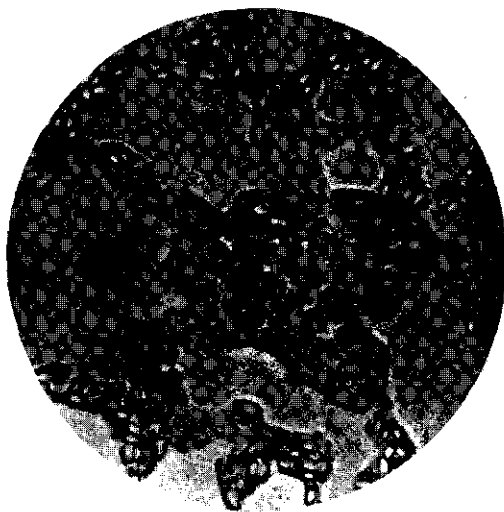
Na explosie is geen CO₂ aanwezig, zoodat methan in het oorspronkelijk gas niet aanwezig was.

Het gas bestond dus uit:

54,1 c.c.	CO ₂
143,7 „	H ₂
51,2 „	N ₂

Totaal . . 249,0 c.c.

Figuur 1.



Boterzuurferment.

Figuur 2.



Experimenteele knijper.

Knijper No. 3.

Totale hoeveelheid gas	70,1 c.c.	
na absorbtie in KOH	42,8 „	
CO ₂		27,3 c.c.
1e genomen van het restant 19,0 c.c.		
aangevuld met lucht tot	60,0 c.c.	
na explosie	40,8 „	
verdwenen	19,2 c.c.	
overeenkomende met H ₂		12,8 c.c.
CH ₄ is afwezig.		
2e genomen van het restant 13,4 c.c.		
met lucht aangevuld tot	52,7 c.c.	
na explosie	39,4 „	
verdwenen	13,3 c.c.	
overeenkomstig met H ₂		8,8 c.c.
CH ₄ is afwezig.		

Het gas bestond dus uit:

27,3 c.c. CO ₂
28,5 „ H ₂
14,3 „ N ₂
Totaal . . 70,1 c.c.

Knijper No. 4.

Totale hoeveelheid gas	59,0 c.c.	
na absorbtie in KOH	35,4 „	
CO ₂		23,6 c.c.
na absorbtie in pyrogallol	35,2 c.c.	
O ₂		0,2 c.c.
genomen van het restant	17,5 c.c.	
met H ₂ aangevuld	22,8 „	
dus toegevoegd		5,3 c.c.
met lucht aangevuld	40,2 c.c.	
na explosie	31,2 „	
verdwenen	9,0 c.c.	
overeenkomende met H ₂		6,0 c.c.
aanwezig was dus H ₂		0,7 c.c.

Het gas bestond dus uit:

23,6	c.c.	CO ₂
0,2	"	O ₂ ¹⁾
1,4	"	H ₂
33,8	"	N ₂

Totaal . . 59,0 c.c.

Knijper No. 5.

Totale hoeveelheid gas	126,0 c.c.
na absorbtie in KOH	88,4 "
CO ₂	37,6 c.c.
na absorbtie in pyrogallol	88,4 c.c.
O ₂	0,0 c.c.
genomen van het restant 22,1 c.c.	
lucht toegevoegd tot	74,2 c.c.
na explosie	52,6 "
verdwenen	21,6 c.c.
overeenkomende met H ₂	14,4 c.c.
na absorbtie in KOH	21,6 c.c.
CO ₂	0,0 c.c.
dus geen methan aanwezig.	

Het gas bestond dus uit:

37,6	c.c.	CO ₂
57,6	"	H ₂
30,8	"	N ₂

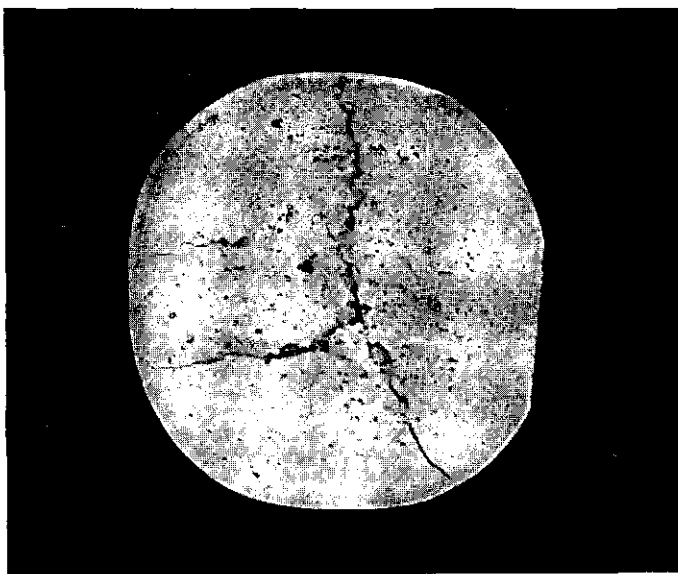
Totaal . . 126,0 c.c.

Knijper No. 6.

Totale hoeveelheid gas	59,0 c.c.
na absorbtie in KOH	35,2 "
CO ₂	23,8 c.c.
genomen van het restant 12,0 c.c.	
lucht toegevoegd tot	59,9 c.c.
na explosie	45,7 "
verdwenen	14,2 c.c.
overeenkomende met H ₂	9,5 c.c.
na absorbtie in KOH	45,7 c.c.
CO ₂	0,0 c.c.
dus methan is niet aanwezig.	

¹⁾ De kleine hoeveelheid zuurstof in Knijper no. 4 gevonden is in het gas gekomen bij het opvangen.

Figuur 3.



K n i j p e r.

Het gas bestond dus uit:

23,8	c.c.	CO ₂
27,7	"	H ₂
7,5	"	N ₂

Totaal . . 59,0 c.c.

Het spreekt wel van zelf, dat door de aanwezigheid van het makkelijk in water oplosbaar koolzuur, de analyses geene absolute beteekenis hebben ¹⁾, doch in het algemeen kan echter wel gezegd worden dat „knijpers” eene belangrijke hoeveelheid gas herbergen, dat bestaat uit wisselende quantiteiten van *Koolzuur*, *Waterstof* en *Stikstof*.

De vraag doet zich nu verder voor, of het ontstaan van de groote spleetvormige holten afhankelijk is van de plasticiteit van het deeg, met andere woorden, of dergelijke kazen een hooger gehalte aan zoogenaamd paracaseïnebilactaat bezitten dan normale.

Hieronder volgen eenige bepalingen, welke hierop betrekking hebben; de cijfers werden verkregen door 1 gram der massa aan te wrijven in een mortier met 100 c.c. 5 % keukenzout-oplossing, vervolgens in een kolfje te brengen en daarna het mengsel gedurende 3 uren te laten staan bij kamertemperatuur, zoo nu en dan omschuddend. Na dien tijd wordt gefiltreerd, een paar maal met eenige c.c. van de keukenzoutoplossing nagespoeld en vervolgens in het filter met residu door middel van de methode Kjeldahl het stikstofgehalte bepaald.

Het zoogenaamd paracaseïnebilactaat, dat de plasticiteit der kaas vermindert, is onoplosbaar in 5 % Na Cl, het zoogenaamd monolactaat oplosbaar, zoodat het stikstofgehalte van het residu aangeeft of eene kaas meer of minder plastisch is ²⁾.

Knijper No. 1.

Totaal N per 1 gram	27,6 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.
onoplosbaar in 5 % Na Cl per 1 gram.	17,2	" $\frac{1}{10}$ "
oplosbaar	10,4 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.

Knijper No. 3.

Totaal N per 1 gram	27,0 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.
onoplosbaar in 5 % Na Cl per 1 gram.	15,2	" $\frac{1}{10}$ "
oplosbaar	11,8 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.

¹⁾ Onlangs is van W. M. Clark eene publicatie verschenen getiteld: A study of the gases of Emmenthal cheese (U. S. Department of Agriculture. Bulletin 151, 1912) waarin een handig toestelletje beschreven wordt om het gas uit de holten, in Emmenthaler kaas voorkomende, boven kwik op te vangen. Misschien ware dit ook bij knijpers te gebruiken.

²⁾ Zie hierover de mededeeling: Over „korte” kaas. Verslagen van landbouwkundige onderzoekingen der Rijkslandbouwproefstations No. IX 1911.

Knijper No. 4.

Totaal N per 1 gram	26,6 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.
onoplosbaar in 5 % Na Cl per 1 gram.	12,25 „	$\frac{1}{10}$ „
oplosbaar	14,35 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.

Op een andere plek der kaas:

Totaal N per 1 gram	25,6 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.
onoplosbaar in 5 % Na Cl per 1 gram.	15,1 „	$\frac{1}{10}$ „
oplosbaar	10,5 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.

Knijper No. 5.

Totaal N in het midden dat week aanvoelt per 1 gram	21,0 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.
onoplosbaar in 5 % Na Cl per 1 gram.	9,05 „	$\frac{1}{10}$ „
oplosbaar	11,95 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.

Totaal N in den kant, welke hard aanvoelt per 1 gram	17,0 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.
onoplosbaar in 5 % Na Cl per 1 gram.	8,7 „	$\frac{1}{10}$ „
oplosbaar	8,3 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.

Knijper No. 6.

Totaal N in het midden, dat week aanvoelt per 1 gram	27,2 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.
onoplosbaar in 5 % Na Cl per 1 gram.	3,4 „	$\frac{1}{10}$ „
oplosbaar	23,8 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.

Totaal in harder gedeelte per 1 gram	26,3 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.
onoplosbaar in 5 % Na Cl per 1 gram.	10,5 „	$\frac{1}{10}$ „
oplosbaar	15,8 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.

Knijper No. 7.

Totaal N per 1 gram	28,2 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.
onoplosbaar in 5 % Na Cl per 1 gram.	15,9 „	$\frac{1}{10}$ „
oplosbaar	12,3 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.

Knijper No. 8.

Totaal N per 1 gram	29,2 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.
onoplosbaar in 5 % Na Cl per 1 gram.	12,55 „	$\frac{1}{10}$ „
oplosbaar	16,65 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.

Op een andere plek der kaas:

Totaal N per 1 gram	29,2 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.
onoplosbaar in 5 % Na Cl per 1 gram.	10,1 „	$\frac{1}{10}$ „
oplosbaar	19,1 c.c.	$\frac{1}{10}$ n.

Knijper No. 9.

Totaal N per 1 gram	24,8 c.c. $\frac{1}{10}$ n.
onoplosbaar in 5% Na Cl per 1 gram.	3,2 „ $\frac{1}{10}$ „
oplosbaar	21,6 c.c. $\frac{1}{10}$ n.

De knijper No. 6 heeft, zooals uit de cijfers blijkt, pleksgewijze eene vrijwel normale smodigheid ¹⁾ en zoo ook No. 9. Hoewel dus in het algemeen dergelijke kazen een hoog gehalte aan paracaseïnebilactaat kunnen bezitten, is dit niet een bepaalde vereischte om de eigenaardige spleet te voorschijn te doen roepen door de gasontwikkeling. Dit staat waarschijnlijk in verband met den groei der knijperbacteriën in de kaasmassa. Zooals we zien zullen kan deze alleen daar plaats grijpen, waar de keukenzoutconcentratie, door het zouten verkregen, niet te hoog is, dus in een betrekkelijk klein middengedeelte der kaas. In dat gedeelte zal dus al het gas, dat zich ontwikkelt, successievelijk gevormd worden, waardoor in verband met de groote hoeveelheid daarvan de massa vaneen gedrukt wordt en eene spleet ontstaat, welke dan hoe langer hoe meer in het overige deel der kaasmassa doordringt. De kaas KNC van 19 December 1912 (bldz. 38), welke het ontstaan der spleet in het midden te zien geeft, is daarvan een voorbeeld.

De samenstelling van het gas geeft eenige aanwijzing onder welke soort bacteriën te zoeken is naar diegenen, welke de indirecte oorzaak zijn van het ontstaan van het gebrek. Dat we hier te maken hebben met eene gasontwikkeling ten koste van de melksuiker, zooals bij „rijzing” het geval is, is buitengesloten met het oog op den tijd waarop het gebrek optreedt. Dit gebeurt, zooals gezegd, na 12 tot 14 dagen, een tijdstip, waarop reeds lang alle melksuiker verdwenen is, ²⁾ en door de melkzuurfermenten in melkzuur is omgezet. De „knijper”-bacterie heeft dus als koolstofbron alleen de beschikking over de melkzure kalk, welke gevormd wordt uit het gevormde melkzuur en de kalkverbindingen van de wrongel, en als stikstofbron de kaasstof. De eerste verbinding zoude het koolzuur en de waterstof kunnen leveren, terwijl de kaasstof op zoodanige wijze wordt aangetast, dat stikstof vrij komt, waardoor het voorkomen der drie gassen koolzuur, waterstof en stikstof in „knijpers” te verklaren is. Waar er nu onder de boterzuurfermenten bacteriën bekend zijn, welke melkzure kalk aantasten onder vorming van boterzuur, koolzuur en waterstof, indien eene voor hun onderhoud gunstige stikstofverbinding aanwezig is, zoo lag het voor de hand in die richting naar de „knijper”-bacteriën te zoeken.

¹⁾ Knijpers hebben dikwerf eene weeke kern, waardoor het verschil in oplosbaarheid in keukenzout op die plek verklaard kan worden.

²⁾ In het Jaarverslag der Proefzuivelboerderij te Hoorn 1904, blz. 63, deelden wij mede, dat bij toevoeging van melkzuurfermenten aan de kaasmelk, reeds na 1 dag melksuiker niet meer is aan te toonen.

De eerste pogingen ter isoleering van de bacterie, waarbij kaas-pap als voedingsbodem werd gebruikt onder wegpompen van de lucht, hadden tot resultaat, dat een mengcultuur verkregen werd van een boterzuurferment en een staafvormig melkzuurferment, behoorende tot die soorten, welke meermalen beschreven zijn in onze verhandelingen over de kaasrijping; tot een rein-cultuur van het boterzuurferment kon het echter langs dezen weg niet komen. Eindelijk gelukte het echter eene goede isoleering te verkrijgen, 'door gebruik te maken van de hoogere doodingstemperatuur van de sporen van dit boterzuurferment.

Deze temperatuur werd als volgt bepaald:

Voor voedingsbodem werd gebruik gemaakt van neutrale Löfflersche bouillon ¹⁾, waaraan $\frac{1}{2}$ % galactose was toegevoegd; proeven in verschillende richting in dit opzicht genomen toch hadden aangetoond, dat het voorliggende boterzuurferment daarin uitstekend groeide. Een reageerbuis, welke in het midden tot een kleinere diameter was uitgetrokken in de blaasvlam, werd gevuld met ongeveer 8 c.c. dezer vloeistof, na sterilisatie geënt met de sporen bevattende bacteriën en vervolgens de vernauwing uitgetrokken tot een capillairbuis ²⁾. De dus geprepareerde buis werd in een waterbad van 28—30° C. geplaatst en door middel van eene kwikpomp luchtledig gepompt, waarbij de vloeistof gaat koken zoodat de laatste restjes zuurstof verwijderd worden door de waterdamp. Nadat het koken goed doorgezet heeft, wordt de capillair in eene kleine vlam verhit en uitgetrokken, waardoor ze toesmelt. Het resultaat van al deze manipulaties was dus een toegesmolten glazen buisje gedeeltelijk gevuld met bouillon, waarin sporenbevattende bacteriën, terwijl de zuurstof totaal verwijderd was. Eenige van dergelijke buisjes werden in water van verschillende temperatuur geheel ondergedompeld, gedurende zekeren tijd daarin verhit en na afloop daarvan bij 22° C. geplaatst om na te gaan in welke der buizen nog groei optrad. Hieronder volgen de resultaten dier proefnemingen.

¹⁾ Deze bouillon werd aldus bereid: Een pond mager rundvleesch, waarvan alle vet is verwijderd, wordt fijngemalen met het bekende gehaktmachinetje en daaraan toegevoegd $\frac{1}{2}$ l. water en 5 gram NaCl, waarna het mengsel gedurende 3 uur in een stoompot verhit wordt. Vervolgens wordt het gefiltreerd door een nat filter, in het filtraat opgelost 5 gram pepton Witte en 5 minuten gekookt op vrije vlam, dan gensureutraliseerd (amphoteer), weer 5 minuten gekookt, nogmaals gefiltreerd, 5 gram dextrose toegevoegd en aangevuld tot 1 l.

²⁾ Het uittrekken van een reageerbuis, welke uit den aard dunwandig is, geschiedt op de volgende wijze: Met eene niet te heete blaasvlam wordt een plek van 2 à 3 c.M. lengte in het midden der buis verhit onder gestadig langzaam ronddraaien tusschen de vingers der beide handen. Daarbij loopt het glas in, wanneer dit geschied is, tot ongeveer de helft van den oorspronkelijken diameter bereikt is, blaast men voorzichtig onder voortdurend draaien tot het ingelooopen deel zich uitzet tot over den oorspronkelijken diameter, laat het glas iets afkoelen en trekt al draaiend de buis uit. Is de buis zeer dunwandig, dan kan men voor men tot uittrekken overgaat eerst het in laten loopen herhalen. Het uittrekken van het vernauwde deel tot een capillair geschiedt op dezelfde wijze, alleen met dit verschil, dat men het uitblazen nalaat.

Duur der verhitting in minuten.	Temperatuur in ° C.	Aantal dagen waarna groei optrad.
10	70—71	ongeveer 14
10	75	" 10
10	75—76	" 14
10	79 ^s —80 ^s	7
8	80	ongeveer 10
10	80	" 14
5	85	" 14
9	85	" 10
10	85 ^s	16
10	88	geen groei na 21 dagen
5	89—90	ongeveer 14
10	90	geen groei na 21 dagen
10	91 ^s —92	" " " 21 "
10	92—92 ^s	" " " 21 "
10	93	geen groei
10	93 ^s	" " na 21 dagen
5	95—96	geen groei
5	100	" "

Hieruit blijkt dus, dat de sporen gedood worden door eene verhitting van 10 minuten bij eene temperatuur gelegen tusschen 85,5 en 88° C., doch dat eene verhittingsduur van 5 minuten tusschen 89—90° C. daartoe ontoereikend is.

Op 7 September 1911 wordt door tussenkomst van den Zuivel-consulent voor Noordholland een knijper ontvangen afkomstig van eene boerderij, waar men met het gebrek te kampen heeft. Den 6den November worden een drietal met de Löfflersche bouillon gevulde buisjes sterk geënt met deze kaas, daarna op de beschreven wijze luchtledig gemaakt, toegesmolten en gedurende 10 minuten in een waterbad van 80° C. verwarmd, waarna ze bij 22° C. worden geplaatst. Op 18 November is in één der buisjes groei opgetreden van eene bewegelijke bacterie met sporen, welke gas en boterzuur produceert. Daarvan worden 3 dagen later culturen aangelegd in gelatine, gemaakt met de Löffl. bouillon + $\frac{1}{2}$ % galactose, van waaruit de koloniën op 1 December in buizen met de bouillon worden overgebracht, zoodat we er in slaagden langs dezen weg het boterzuurferment in reïncultuur te verkrijgen, hoewel de kaas toen reeds minstens 2 maanden oud was. Op dezelfde wijze gelukte het uit een „knijper”, welke langs experimenteelen weg gemaakt was, wederom het aan de melk toegevoegde boterzuurferment te isoleeren.

Op 11 Maart 1912 wordt eene kaas gemaakt uit mengmelk waaraan melkzuurfermenten zijn toegevoegd en 8 c.c. van een boterzuurferment in gelatinecultuur. Op 28 Maart worden van die kaas, welke een knijper is geworden, culturen aangelegd

in buisjes met bouillon, welke buisjes na luchtledig gepompt te zijn 10 minuten op 80° C. worden verhit en bij 22° C. geplaatst. Den 3den April is groei, gepaard met sterke gisting, in alle 6 buisjes opgetreden. Bij opening blijkt eene sterke spanning te heerschen, is boterzuur aanwezig en wordt de groei veroorzaakt door het boterzuurferment. Op overeenkomstige wijze geschiedde de isolatie ook nog uit het mengsel van boterzuurfermenten en staafvormig melkzuurferment, dat bij eene eerste poging verkregen werd, zooals eerder medegedeeld is.

Zoo ook nog in de beide volgende gevallen van knijpers uit de praktijk, welke ons eveneens door tusschenkomst van voornoemden Zuivelconsulent in handen kwamen.

Op 19 Juli 1912 ontvingen we een knijper, welke het gebrek in lichten graad vertoont. Op 20 Juli worden 6 buisjes met bouillon zwaar geënt met de kaasmassa, luchtledig gepompt en 10 minuten op 80° C. verhit en bij 22° C. geplaatst. Op 30 Juli begint in één ervan gasontwikkeling op te treden. Bij opening blijkt dat de inhoud naar boterzuur riekt en de staven aanwezig zijn.

Op 24 September 1912 wordt ons een knijper gezonden welke ongeveer 50 dagen oud is. Op 25 September anaerobe culturen aangelegd, welke 10 minuten bij 80° C. verhit worden en bij 22° C. gezet; 5 dagen later is in alle buisjes groei te constateeren, ze bevatten staven, gas is aanwezig en de inhoud riekt naar boterzuur. Op 4 October worden daaruit culturen aangelegd in neutrale Löfflersche gelatine + $\frac{1}{2}$ % galactose, waarin op 7 October zich reeds koloniën beginnen te ontwikkelen. Op 12 October wordt een gelatinecultuur geopend, en blijkt dat de kolonies gevormd worden door staven, dat gas aanwezig is en ook boterzuur.

Dat „knijpers” boterzuurfermenten als specifieke bacteriënsoort herbergden, bleek wel daaruit, dat uit normale kazen langs dezen weg een boterzuurferment niet te isoleren was. Edammer kazen 14 dagen, 1 en 2 maanden oud, deden in buisjes met bouillon na verhitte op 80° C., ofschoon zeer zware enting was toegepast, en van elke kaas 9 buisjes waren aangelegd, na 1 maand geen groei ontstaan, zoodat boterzuurfermenten in normale kazen zeer weinig of niet voorkomen.

Wat de verdere biologische eigenschappen van het boterzuurferment aangaat kan het onderstaande aangetekend worden.

Zooals reeds vermeld ontwikkelt zich de bacterie het best in neutrale Löfflersche bouillon, waaraan $\frac{1}{2}$ % galactose is toegevoegd. Ongeveer 7 dagen na de enting treedt daarin groei op begeleid door eene zeer intensieve gasontwikkeling. Na eenige dagen houdt deze laatste op en komen de bacteriën opgehoopt op den bodem te liggen, terwijl de bovenstaande vloeistof helder wordt.

Het gas bestaat uit koolzuur, waterstof en stikstof, zooals uit de volgende analyses blijkt.

Op 16 November 1911 worden twee kolfjes van goed 100 c.c.

inhoud, ieder gevuld met 30 c.c. bouillon, geënt, de lucht uit-
gepompt, toegesmolten en bij 22° C. geplaatst. 14 dagen later
worden ze onder water geopend en het gas opgevangen in een
met water volgezogen omgestulpte trechter.

1e kolfje.

totale hoeveelheid gas	99,8 c.c.	
na absorbtie in KOH	63,0 „	
CO ₂		36,8 c.c.
na absorbtie in pyrogallol	63,0 c.c.	
O ₂		0,0 c.c.
van het restant genomen 10,0 c.c.		
aangevuld met lucht tot	30,0 c.c.	
na explosie	17,4 „	
verdwenen	12,6 c.c.	
overeenkomende met H ₂		8,4 c.c.

Het gas bestond dus uit:

36,8 c.c.	CO ₂
52,9 „	H ₂
10,1 „	N ₂

Totaal . . . 99,8 c.c.

2e kolfje.

totale hoeveelheid gas	82,2 c.c.	
na absorbtie in KOH	52,3 „	
CO ₂		29,9 c.c.
na absorbtie in pyrogallol	52,0 c.c.	
O ₂		0,3 c.c.
van het restant genomen 9,8 c.c.		
aangevuld met lucht tot	30,4 c.c.	
na explosie	17,8 „	
verdwenen	12,6 c.c.	
overeenstemmende met H ₂		8,4 c.c.
na explosie geen CO ₂ aanwezig, zoodat CH ₄ ontbrak.		

Het gas bestond dus uit:

29,9 c.c.	CO ₂
0,3 „	O ₂ ¹⁾
44,6 „	H ₂
7,4 „	N ₂

Totaal . . . 82,2 c.c.

¹⁾ De aanwezige zuurstof is bij het opvangen in het gas gekomen door luchttoetreding.

Dit 2e kolfje was gevuld met bouillon, waaraan na neutralisatie per Liter was toegevoegd 21 c.c. norm. Na OH oplossing. In dergelijke alcalische bouillon met $\frac{1}{2}$ % galactose treedt echter minder snel groei op dan in de neutrale.

Evenals Löfflersche bouillon zonder toevoeging van galactose kan ook kaaspap als voedingsmedium dienst doen. Deze kaaspap wordt gemaakt uit kaas van 5—14 dagen oud met toevoeging van gedestilleerd water. De kaas wordt daartoe met een vleeschmolentje fijn gemalen en eene hoeveelheid er van in het kolfje of buisje gebracht, waarna zooveel water wordt bijgegoten dat eene dikke pap ontstaat bij flink schudden. Na sterilisatie kan dan tot enting worden overgegaan. Bij cultiveeren in buisjes komt het gewoonlijk voor, dat de kaasmassa zich bij de vernauwing der uitgetrokken buis als een dikke koek, welke de enting bemoeilijkt, vastzet boven het vocht; door deze koek met een glazen staaf naar beneden te duwen en nogmaals steriliseeren is dit euvel te verhelpen. Hoewel niet in die mate als in bouillon heeft ook in dergelijke culturen een sterke gasontwikkeling plaats. Een kolfje van 100 c.c. met kaaspap, geënt op 16 November 1911, bevatte op den 30sten van die maand:

een totale hoeveelheid gas van	45,0 c.c.	
waarvan na absorbtie in loog overbleef	25,8 „	
het bevatte dus CO ₂		19,2 c.c.
na absorbtie in pyrogallol	25,7 c.c.	
dus aan O ₂		0,1 c.c.
genomen van het residu	10,4 c.c.	
met lucht aangevuld tot	29,8 c.c.	
na explosie	17,8 „	
dus verdwenen	12,0 c.c.	
overeenkomende met H ₂		8,0 c.c.

Het gas bestond dus uit:

19,2 c.c.	CO ₂
19,8 „	H ₂
0,1 „	O ₂ ¹⁾
5,9 „	N ₂
Totaal	45,0 c.c.

Een drietal van dergelijke culturen in kaaspap, welke geënt waren op 16 Augustus 1912 en geopend op 23 Augustus 1912 bevatten respectievelijk:

¹⁾ De aanwezige zuurstof is bij het opvangen in het gas gekomen door luchttoetreding.

	1.	2.	3.
C O ₂	45,8 c.c.	37,6 c.c.	43 c.c.
H ₂	48,3 „	42,4 „	47 „
N ₂	2,3 „	2,2 „	2 „
Totaal	96,4 c.c.	82,2 c.c.	92 c.c.

zoodat blijkt, dat èn in bouillon èn in kaaspap dezelfde gassen gevormd worden, namelijk koolzuur, waterstof en stikstof.

Bedraagt het gasmengsel een tamelijk aantal c.c. in de verschillende culturen, daartegenover staat dat de hoeveelheid van het gevormde boterzuur niet zoo heel groot is. Als bewijs daarvoor kan de volgende proef dienen.

Op 30 Maart 1912 worden 3 kolfjes, in ieder waarvan 50 c.c. neutrale Löfflersche bouillon + $\frac{1}{2}$ % galactose, geënt met het boterzuurferment. Op 13 April worden ze geopend en de gezamenlijke vloeistof in vacuo bij ongeveer 60° C. afgedestilleerd. Nadat van de 150 c.c. 130 c.c. zijn overgegaan wordt het destillaat getitreerd en zijn ter neutralisatie 7,1 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. loogoplossing noodig, zoodat in die 3 culturen te zamen in 14 dagen gevormd waren 7,1 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. boterzuur of $7,1 \times 0,0088$ gram = 62,5 milligram.

Met het oog op het gedrag van het ferment in de kaas werd nagegaan hoe het zich hield in neutrale Löfflersche bouillon + $\frac{1}{2}$ % galactose, waaraan melkzuur was toegevoegd. Op 28 November 1911 werden eene reeks buisjes, bevattende ieder 10 c.c. bouillon en afwisselende hoeveelheden verdund melkzuur, geënt met een boterzuurferment en geplaatst bij 22° C. Nagegaan werd nu of al dan niet bacterieontwikkeling plaats greep. Onderstaande tabel geeft de resultaten van het onderzoek weer; het teken + daarin geeft aan dat groei, het teken — dat geen groei op den aangegeven datum was opgetreden.

Aantal c.c. $\frac{1}{10}$ norm. melkzuur dat toegevoegd is.	Datum der waarneming.	
0,0	4 Dec. 1911	+
0,1	4 „ 1911	+
0,3	4 „ 1911	+
0,5	4 „ 1911	+
0,7	5 „ 1911	+
0,9	4 „ 1911	+
1,1	11 „ 1911	+
1,3	5 „ 1911	+
1,5	6 „ 1911	+
1,7	12 „ 1911	+
1,9	19 „ 1911	—

Bij eene toevoeging van 1,9 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. melkzuur aan 10 c.c. neutrale bouillon trad dus voor dit ferment geen groei meer

op na 3 weken. Het bleek echter, dat deze zuurgraad niet voor alle bacteriën schadelijk werkt. Bij eene herhaling der proef toch met een ander boterzuurferment moest meer zuur toegevoegd worden voor de groei verhinderd werd. De enting voor die proef had plaats 28 December 1911.

Aantal c.c. $\frac{1}{10}$ norm. melkzuur dat toegevoegd is.	Datum der waarneming.	
1,7	5 Jan. 1912	+
1,9	8 „ 1912	+
2,1	10 „ 1912	+
2,3	11 „ 1912	+
2,5	15 „ 1912	+
2,7	22 „ 1912	—

Voor deze bacterie moest alzoo de toegevoegde hoeveelheid melkzuur opgedreven worden tot 2,7 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. per 10 c.c. bouillon om groei tegen te gaan. In het algemeen kan dus gezegd worden dat de knijperbacterie tegen een melkzuurgehalte bestand is, zooals dat ongeveer in kaas aanwezig is.

Wat het vormen van koloniën betreft, dit geschiedt goed in de neutrale gelatine op de bekende wijze gemaakt uit de neutrale Löfflersche bouillon + $\frac{1}{2}$ % galactose. Na ongeveer 7 dagen ontstaan daarin ronde koloniën van ongeveer $\frac{1}{3}$ m.M. middellijn, welke op den omtrek meer en minder wazige plekje hebben en daardoor het aspect vertoonen van gestolde wasdruppels. Vervloeiing van de gelatine heeft niet plaats, doch evenals in de bouillon wordt in sterke mate gas ontwikkelt, waardoor de gelatine plaatselijk vaneen wordt gereten, terwijl een sterke reuk naar boterzuur wordt waargenomen.

Het aanleggen der gelatineculturen geschiedt op dezelfde wijze als bij de bouillonculturen, dus in toegesmolten glazen buizen, waaruit de lucht verwijderd is door pompen en verhitten in een waterbad op 28—30° C., alleen zij er op gewezen, dat de gelatine zeer zwaar geënt moet worden om koloniën te doen ontstaan. Bij het afkoelen en vastvorden der gelatine komt het gewoonlijk voor dat zich daarin blazen vormen, hetgeen echter van geen invloed is op het verder verloop der cultiveering.

De afmetingen bedragen voor deze staafvormige bacteriën, wat de lengte betreft, ongeveer 3,75 μ , wat de dikte betreft 1,65 μ , in oudere culturen in neutrale Löfflersche bouillon + $\frac{1}{2}$ % galactose komen echter in massa ronde degeneratievormen voor.

Het vormen van sporen geschiedt in zeer geringe mate in bouillon, daarentegen zeer goed in gelatine. Praeparaten van koloniën uit 16 dagen oude culturen bevatten reeds sporenhoudende bacillen. Ze ontstaan aan een der uiteinden van de bacteriën en zijn dus eindstandig. In bouillon met $3\frac{1}{2}$ % keukenzout treden evolutievormen op en komen clostridiën met sporen voor. Over

hunne doodingstemperatuur is reeds hierboven het een en ander medegedeeld.

Bewegelijkheid treedt op in 6 dagen oude culturen in de bouillon, waaraan per 10 c.c. $\frac{1}{2}$ c.c. $\frac{1}{10}$ normaal melkzuur is toegevoegd; wanneer echter met één c.c. wordt aangezuurd is de eigen beweging minder. Daarentegen blijft deze geheel uit in de neutrale bouillon. Met Joodtinctuur kleuren zich de bacteriën egaal geel; wanneer echter sporen voorkomen of tegen het begin der sporenvorming, ontstaan daarmede plaatselijk sterk donkerbruine vlekken, terwijl het overige gedeelte lichtgeel getint is. In de hierachter voorkomende photographie van de met jodium gekleurde sporenbevattende bacteriën zijn deze vlekken duidelijk zichtbaar.

Ten opzichte van de zuurstof gedraagt het boterzuurferment zich streng anaerob, zelfs in een reageerbuis geheel gevuld met gelatine treedt niet de minste groei op. Het ferment komt zeer goed op bij ongeveer 22° C., bij welke temperatuur een bouillon- of gelatinecultuur ongeveer 7 dagen noodig heeft om tot ontwikkeling te komen, bij lagere temperatuur gaat dit langzamer; zoo duurde het bij eene temperatuur, wisselende tusschen $9\frac{1}{2}$ tot $11\frac{1}{2}^{\circ}$ C., eene maand, voor eene uiterst geringe groei optrad in de bouillon, terwijl bij $11-15^{\circ}$ C. deze tijd verminderd werd tot 24 dagen.

Om na te gaan of het uit de „knijpers” geïsoleerde boterzuurferment werkelijk de oorzaak was van het gebrek, werden op de gewone wijze kazen gemaakt uit melk, waaraan eene reincultuur van die bacteriën was toegevoegd. Daarbij werd in het begin gebruik gemaakt van bouillonculturen, doch toen het bleek dat met deze wel „knijpers” verkregen werden doch niet altijd (men kon daarbij op ongeveer 25 % resultaat rekenen), is overgegaan tot het gebruik van reinculturen in gelatine, waarmede altijd „knijpers” ontstonden. Waarschijnlijk hangt dit verschil in het gedrag van gelatine en bouillonculturen samen met eene minder sterke virulentie der laatste, welke zeer wisselend schijnt te zijn; tenminste later, toen de bacteriën langen tijd in cultuur waren geweest, gaven de bouillonculturen weder een 100 % resultaat. Hieronder volgt de opgave van deze proeven.

18 December 1911. Gemaakt eene kaas, gemerkt K N M, uit de mengmelk der boerderij, waaraan toegevoegd is geworden zoogenaamde reincultuur (melkzuurfermenten), handelsstremsel en kleursel en 75 c.c. van eene 7 dagen oude reincultuur van een boterzuurferment in de neutrale Löfflersche bouillon + $\frac{1}{2}$ % galactose. Verder was nog in de melk opgelost 125 dus $\frac{1}{2}$ % melksuiker, tencinde de kaas „kort” te maken met het oog op den invloed der plasticiteit van het deeg op de scheurvorming.

Op 2 Januari 1912 is deze kaas een „knijper” met mooie, dwarse spleet en zeer kort.

21 Februari 1912. Gemaakt op dezelfde wijze eene kaas, gemerkt K N W 3, uit mengmelk, alleen is geen melksuiker, doch 10 %

gekookt water toegevoegd en zijn 50 c.c., reïncultuur van het boterzuurferment gebruikt, welke 8 dagen oud was.

Op 4 Maart is deze kaas een „knijper”.

22 Februari 1912. Gemaakt op dezelfde wijze eene kaas, gemerkt KNM 4. Aan de melk is daarbij wederom $\frac{1}{2}$ % melksuiker toegevoegd en 50 c.c. reïncultuur van het boterzuurferment gebruikt.

Op 4 Maart is deze kaas een „knijper”, de scheur liep tot onder de korst door, zoodat de gootvormige verzinking daarin ontstaan is.

6 Maart 1912. Gemaakt uit 50 L. mengmelk 2 kazen, gemerkt BSM en BW. Toegevoegd wordt handelskleursel en stromsel en zoogenaamde reïncultuur (melkzuurbacteriën). Bovendien is in de melk waaruit BSM bereid is $\frac{1}{2}$ % melksuiker opgelost en in die voor BW 10 % gekookt water gebracht. Verder wordt voor beide kazen de melk geënt met elk 1 buisje of ongeveer 8 c.c. van eene gelatinecultuur van het boterzuurferment, welke 22 dagen oud zijn.

Op 16 Maart is BW een flinke „knijper” en is de inwendige scheur aan de korst te zien. Op 26 Maart is BSM een flinke „knijper”, verder tamelijk kort en zijn groote „boekelscheuren” aanwezig.

11 Maart 1912. Gemaakt 2 kaasjes geheel op dezelfde wijze als die van 6 Maart, gemerkt KNM en KNW. Bij de eerste is melksuiker gebruikt, bij de laatste gekookt water toegevoegd. De gebruikte gelatineculturen zijn 17 dagen oud.

Op 21 Maart is KNW een flinke „knijper” waarvan de scheur tot onder de korst doorloopt en daarin een gootje heeft gevormd. Op 28 Maart is KNM een flinke „knijper”, de scheur is uitwendig te zien. Verder komen eenige mooie „boekelscheuren” voor. Eene kaas welke uit dezelfde mengmelk op de boerderij gemaakt was op 11 Maart werd op 16 April opengesneden, doch was heel mooi gesloten.

29 Maart 1912. Gemaakt van 50 L. mengmelk 2 kaasjes, gemerkt KN en KN. Voor de bereiding is voor beide kazen eveneens handelsstromsel en kleursel en zoogenaamde reïncultuur gebruikt. Verder is aan de melk van ieder toegevoegd ongeveer 8 c.c. gelatinecultuur van het boterzuurferment, welke 15 dagen oud waren.

Van de kaasjes, welke op denzelfden dag uit dezelfde melk op de boerderij zijn bereid, wordt één gemerkt C, om als contrôlekaas te dienen.

Op 16 April zijn KN en KN beide knijpers. De contrôlekaas C was goed.

1 April 1912. Gemaakt 2 kazen, gemerkt KN 2 en KN 3, geheel op dezelfde wijze als op 29 Maart. De gebruikte gelatineculturen van het boterzuurferment zijn echter 17 dagen oud.

Van de kazen, welke op denzelfden dag uit dezelfde mengmelk op de boerderij zijn bereid, is één gemerkt A, om als contrôle te dienen.

Op 12 April is KN 2 een flinke „knijper”, waarvan de scheur uitwendig te constateeren is; bovendien komen vele „boekelscheuren” voor. Op 16 April is KN 3 een „knijper” geworden en bevat veel „boekelscheuren”, terwijl de contrôlekaas A op dien datum mooi is.

12 April 1912. Gemaakt van ongeveer 48 L. aseptisch gemolken melk 2 kazen, gemerkt BS en C. Bij de bereiding is voor beide kazen gebruikt steriele leb, kleursel en zoogenaamde reïncultuur. C is eene contrôlekaas. BS bevat ongeveer 1,6 c.c. gelatinecultuur van het boterzuurferment 13 dagen oud.

Op 25 April zijn beide kazen opengesneden. BS was een flinke „knijper” en had bovendien eenige groote „boekelscheuren”. C vertoonde geen afwijkingen.

17 April 1912. Gemaakt van ongeveer 48 L. aseptisch gemolken melk 2 kazen, gemerkt C en P.R. Bij de bereiding is voor beide kazen gebruikt steriel stremsel, kleursel en eene reïncultuur van een melkzuurferment uit kaas geïsoleerd. C is eene contrôlekaas.

P.R. bevat bovendien 10 c.c. van eene reïncultuur van het boterzuurferment in neutrale Löfflersche bouillon + $\frac{1}{2}$ % galactose, 8 dagen oud.

Op 1 Mei is P.R. een flinke „knijper”, de scheur is uitwendig te constateeren. C is goed op het geluid.

Op 22 Juli zijn beide kazen opengesneden. P.R. is een flinke „knijper”, bevat enkele boekelscheuren. C is mooi gesloten.

24 April 1912. Gemaakt van ongeveer 50 L. aseptisch gemolken melk 2 kazen, gemerkt C en P.R. Bij de bereiding is voor beide kazen gebruikt steriel stremsel, kleursel en reïncultuur van een melkzuurferment (hetzelfde als op 17 April 1912). C is eene contrôlekaas.

P.R. bevat bovendien 10 c.c. bouilloncultuur van het boterzuurferment, 7 dagen oud.

Op 15 Mei is P.R. een „knijper”, de scheur is uitwendig te constateeren. C is goed op het geluid.

Op 22 Juli zijn beide kazen opengesneden. P.R. is een enorme dubbele „knijper”, bevat enkele boekelscheuren. C is mooi gesloten.

1 Mei 1912. Gemaakt van ongeveer 49 L. aseptisch gemolken melk 2 kazen, gemerkt C en R.P. Bij de bereiding is voor beide kazen gebruikt steriel stremsel, kleursel en reïncultuur van hetzelfde melkzuurferment. C is eene contrôlekaas.

R.P. bevat bovendien 10 c.c. bouilloncultuur van het boterzuurferment, 8 dagen oud.

Op 1 Augustus 1912 zijn beide kazen opengesneden. R.P. vertoonde een flinke knijper en eenige groote boekelscheuren. C is mooi gesloten.

8 Mei 1912. Gemaakt van ongeveer 48 L. aseptisch gemolken melk 2 kazen, gemerkt C en P.R. Bij de bereiding is voor beide kazen gebruikt steriel stremsel, kleursel en reïncultuur van hetzelfde melkzuurferment. C. is eene contrôlekaas.

P R bevat bovendien 1 c.c. van eene bouilloncultuur van een ander boterzuurferment, 15 dagen oud.

Op 22 Mei is P R een „knijper” geworden, de scheur is uitwendig te constateeren. C is goed.

Op 23 Augustus zijn beide kazen opengesneden. P R vertoont een flinke knijper, bevat eenige onregelmatige holten. C is goed gesloten.

17 Mei 1912. Gemaakt van ongeveer 49 L. aseptisch gemolken melk 2 kazen, gemerkt C en P R. Bij de bereiding is voor beide kazen gebruikt steriel stremsel, kleursel en reïncultuur van hetzelfde melkzuurferment. C is eene contrôlekaas.

P R bevat bovendien 1 c.c. van eene bouilloncultuur van het boterzuurferment, welke 10 dagen oud is.

Op 3 Juni is P R een „knijper” geworden, de scheur is uitwendig te zien. C is goed op het geluid.

Op 22 Juli zijn beide kazen opengesneden. P R is een enorme dubbele knijper (scheur ongeveer 2 c.M. wijd) en bevat enkele boekelscheuren. C is mooi gesloten.

Uit deze proeven blijkt dus, dat de uit „knijpers” geïsoleerde boterzuurfermenten in staat zijn het gebrek te voorschijn te roepen en wel in een tijdsverloop overeenkomende met een dat in de praktijk geconstateerd is geworden. Dat ook de samenstelling van het gas in deze, langs experimenteelen weg verkregen, „knijpers” geheel hetzelfde is als in die uit de praktijk, kan blijken uit de volgende analyses van het gas besloten in eenige van die kazen.

Kaas van 21 Februari 1912 geopend onder water:

totale hoeveelheid gas	24,6 c.c.	
na absorbtie in KOH	18,0 „	
dus CO ₂		6,6 c.c.
na absorbtie in pyrogallol . .	18,0 c.c.	
dus O ₂		0,0 c.c.
van het restant genomen 8,8 c.c.		
aangevuld met lucht tot . . .	14,0 c.c.	
na explosie	11,4 „	
verdwenen	2,6 c.c.	
overeenkomende met H ₂		1,7 c.c.
na absorbtie in KOH	11,4 c.c.	
dus CO ₂	0,0 c.c.	
zoodat geen CH ₄ aanwezig was.		

Het gas bestond dus uit:

	6,6 c.c. CO ₂
	3,5 „ H ₂
	14,5 „ N ₂
Totaal . .	24,6 c.c.

Kaas van 6 Maart 1912 gemerkt BW:

totale hoeveelheid gas	42,6 c.c.	
na absorbtie in KOH	26,9 „	
dus CO ₂		15,7 c.c.
na absorbtie in pyrogallol . .	26,8 c.c.	
dus O ₂		0,1 c.c.
genomen van het restant 10,0 c.c.		
met lucht aangevuld tot . . .	30,0 c.c.	
na explosie	18,2 „	
verdwenen	11,8 c.c.	
overeenkomende met H ₂		7,87 c.c.
na absorbtie in KOH	18,2 c.c.	
CO ₂	0,0 c.c.	
zoodat geen methan aanwezig is.		

Het gas bestond dus uit:

15,7 c.c. CO ₂
21,2 „ H ₂
0,1 „ O ₂
5,6 „ N ₂

Totaal . . 42,6 c.c.

Kaas van 6 Maart 1912 gemerkt BSM:

totale hoeveelheid gas	30,0 c.c.	
na absorbtie in KOH	21,0 „	
dus CO ₂		9,0 c.c.
na absorbtie in pyrogallol . .	21,0 c.c.	
dus O ₂		0,0 c.c.
genomen van het restant 10,0 c.c.		
aangevuld met lucht tot . . .	34,8 c.c.	
na explosie	27,6 „	
verdwenen	7,2 c.c.	
overeenkomende met H ₂		4,8 c.c.
na absorbtie in KOH	27,6 c.c.	
CO ₂	0,0 c.c.	
zoodat geen methan aanwezig is.		

Het gas bestond dus uit:

9,0	c.c.	CO ₂
10,1	„	H ₂
10,9	„	N ₂

Totaal . . 30,0 c.c.

Kaas van 11 Maart 1912 gemerkt K N W.

totale hoeveelheid gas	56,0 c.c.	
na absorbtie in K O H	35,4 „	
dus CO ₂		20,6 c.c.
na absorbtie in pyrogallol . . .	35,4 c.c.	
dus O ₂		0,0 c.c.
genomen van het restant	10,0 c.c.	
met lucht aangevuld tot	50,0 „	
na explosie	38,4 „	
verdwenen	11,6 c.c.	
overeenkomende met H ₂		7,7 c.c.
na absorbtie in K O H	38,4 c.c.	
dus CO ₂	0,0 c.c.	
zoodat geen methan aanwezig is.		

Het gas bestond dus uit:

20,6	c.c.	CO ₂
27,2	„	H ₂
8,2	„	N ₂

Totaal . . 56,0 c.c.

Deze analyses toonen dus aan dat het gas eveneens bestaat uit een mengsel van koolzuur, waterstof en stikstof in wisselende hoeveelheden, zoodat uit de proeven besloten mag worden, dat „knijpers” ontstaan door infectie der melk met virulente boterzuurfermenten.

Het tot stand komen van eene dergelijke infectie kan langs verschillende wegen geschieden. Boterzuurfermenten toch behooren tot de meest verspreide bacteriënsoorten, en het hangt er dus alleen van af of de besmetting plaats grijpt met goed virulente exemplaren in voldoende hoeveelheid of „knijpers” ontstaan zullen of niet.

Dat het betrekkelijk gemakkelijk is zich eene virulente soort te verschaffen, bleek wel daaruit, dat wij er in slaagden uit koefaeces een boterzuurferment te isoleeren dat in staat was „knijpers” te veroorzaken. Bij deze isolatie werden eerst eenige overentingingen in kaaspap gedaan, teneinde andere sporenvormende

bacteriën, rottingsbacteriën enz. zooveel mogelijk buiten te sluiten. Deze voedingsbodem is toch door zijne zure eigenschappen en bijzondere samenstelling niet geschikt voor dergelijke bacteriën; terwijl bij dadelijke enting in bouillon en verhitting daarvan, ook de sporen van niet boterzuurfermenten, welke daarin eveneens een uitstekenden voedingsbodem vinden, tot ontwikkeling zouden komen.

Den 7den Maart 1912 worden 5 buisjes met kaaspap sterk geënt met koefaeces en bij 22° C. geplaatst. Op 19 Maart worden ze geopend, omdat in eenige er van gasbellen te zien zijn in de door de sterilisatie gevormde kaaskoek. Van twee dezer culturen, welke naar boterzuur rieken en gas bevatten, worden opnieuw een viertal overentingen gedaan in kaaspap. Op 4 April worden de buizen, waarin wederom gas te constateeren valt, geopend en eenige overentingen gedaan in neutrale Löfflersche bouillon + $\frac{1}{2}$ % galactose; deze buizen worden gedurende 10 minuten bij 80° C. verhit en bij 22° C. geplaatst. 7 dagen ¹⁾ daarna is in alle flinke groei opgetreden, veroorzaakt door staafvormige bacteriën, waarvan de lengte 3,75 μ en de breedte 1,6 μ is; eigen beweging is op te merken.

Van uit deze buizen worden culturen aangelegd in Löfflersche gelatine + $\frac{1}{2}$ % galactose en komen daarin na eene week twee soorten koloniën op, de bekende ronde met wasachtig aspect en eene welke hetzelfde aspect heeft, doch vlokkig is; ook deze laatste blijkt een boterzuurferment te zijn. Met deze beide soorten zijn eveneens kaasproeven genomen.

10 Mei 1912. Gemaakt van 48 L. mengmelk 2 kazen, gemerkt KN en KN; bij de bereiding is gebruik gemaakt van stremsel, kleursel en zogenaamde reïncultuur (melkzuurfermenten) der proefzuivelboerderij. Beide kazen bevatten verder ongeveer 12 c.c. reïncultuur in gelatine van het ronde koloniënvormend boterzuurferment uit koefaeces. Van de kazen uit dezelfde mengmelk bereid op de boerderij wordt één gemerkt B gebruikt als contrôle.

Op 29 Mei is KN een flinke „knijper”, de scheur is uitwendig te constateeren, verder zijn vele „boekelscheuren” aanwezig.

Den dag daarna wordt KN doorgesneden, en blijkt een zeer groote scheur aanwezig te zijn. De contrôlekaas B is geheel normaal.

21 Mei 1912. Gemaakt 2 kazen gemerkt KNV en KN, geheel op dezelfde wijze als op 10 Mei.

KNV bevat ongeveer 8 c.c. reïncultuur in gelatine van het vlokkige koloniënvormend boterzuurferment uit koefaeces.

KN bevat ongeveer 8 c.c. reïncultuur in gelatine van het ronde koloniënvormend boterzuurferment uit koefaeces.

¹⁾ Bij eene andere isolatie duurde het veel langer, ongeveer 3 weken, vóór de groei in bouillon optrad. Dikwijls komt het voor dat bouillons, welke op geheel dezelfde wijze bereid zijn, eene verlenging in ontwikkelingstijd veroorzaken.

Van de kazen uit dezelfde mengmelk op de boerderij gemaakt wordt één gemerkt A gebruikt als contrôle.

Op 3 Juni zijn K N V en K N beide knijpers geworden, de scheuren zijn uitwendig te zien. De contrôlekaas A is geheel normaal.

Ten einde ook in dit geval de geheele overeenkomst met knijpers uit de praktijk aan te toonen is de kaas, gemaakt op 10 Mei 1912, gemerkt K N, op 29 Mei onder water opengesneden om het gas te kunnen verzamelen.

De totale hoeveelheid bedroeg.	119,4 c.c.
na absorbtie in K O H	73,4 „
dus CO ₂	46,0 c.c.
na absorbtie in pyrogallol . . .	73,1 c.c.
dus O ₂	0,3 c.c.
van het restant genomen.	12,0 c.c.
aangevuld met lucht tot . . .	50,0 c.c.
na explosie	35,5 „
dus verdwenen	14,5 c.c.
overeenkomende met H ₂	9,7 c.c.

Het gas bestond dus uit:

46,0 c.c.	CO ₂
59,1 „	H ₂
14,3 „	N ₂

Totaal . . . 119,4 c.c.

Ook hier is dus een mengsel van koolzuur, waterstof en stikstof aanwezig, zoodat boterzuurfermenten uit koefaeces geïsoleerd in staat blijken te zijn „knijpers” te veroorzaken.

Eene eigenaardigheid van „knijpers” is dat de scheur zich gewoonlijk vertikaal plaatst, als men onder vertikaal aanneemt, loodrecht op den volgerrand; wel komen ook andere standen voor, doch dit zijn uitzonderingen. Men veronderstelt dat dit in verband staat met spanningen, welke in de kaasmassa zouden optreden door den druk onder de pers. De mogelijkheid langs experimenteelen weg „knijpers” te maken stelde ons ook in staat in deze quaestie eenig licht te ontsteken. Hoewel het mogelijk was dat de persdruk invloed had, kon echter dit ook de wijze van opstellen der kaas hebben. De gewone wijze van het neerzetten der kaas na het zouten, wanneer ze van de gatenborden afkomt, d.w.z. als ze 7 dagen oud is, is juist om en om op den volgerkant en de daartegenover gelegen zijde, waardoor de platte bodems, door het wisselend rusten op die zijden ontstaan en die dus evenwijdig aan den

volgerrand loopen. Men kan het zich nu zoo voorstellen, dat het gas de kaasmassa wegdrukt naar den kant, waar de minste weerstand geboden wordt, dat is hier zijwaarts, daar in elke andere richting een grooter of kleiner gewichtsdeel der kaas als het ware omhoog getild zoude moeten worden. De scheur zal volgens deze beschouwing dus loodrecht komen te staan op de steunvlakken, dus ook vertikaal ten opzichte van den volgerrand. Als men dus de kazen niet zette op den volgerkant en de tegenovergestelde zijde, doch op den zijkant en daarin dus de beide bodems liet ontstaan, dan zoude de scheur, indien bovenstaande verklaring juist mocht zijn, weder loodrecht moeten staan op beide steunvlakken, dus in dit geval meerendeels evenwijdig of zoo goed als evenwijdig aan den volgerrand. Om na te gaan of dit werkelijk zoo geschiedde zijn de kazen van 1 April 1912 gemerkt KN 2 en KN 3, die van 10 Mei 1912 gemerkt KN en op 21 Mei 1912 gemaakt, gemerkt KN, op den zijkant gezet. Het bleek toen de kazen „knijpers” geworden waren, dat de scheuren bij alle loodrecht stonden op de steunvlakken en evenwijdig liepen aan den volgerrand, zoodat de verklaring omtrent den vertikalen stand der scheur juist kon genoemd worden.

Zooals uit de verschillende aantekeningen omtrent de proeven te zien is, traden bij verschillende kazen, welke met boterzuurfermenten geënt waren, boekelscheuren op. In verband hiermede doet zich de vraag voor of de gasontwikkeling, welke boekelscheuren ¹⁾ in het algemeen doet ontstaan, ook niet veroorzaakt wordt door boterzuurfermenten. Het optreden van boekelscheuren in de kaasmassa na ongeveer 12 dagen en de samenstelling van het gas dat ze bevatten, te weten stikstof, koolzuur en waterstof, zijn twee eigenschappen, welke geheel in de lijn liggen van die, welke we van de hierbedoelde boterzuurfermenten hebben leeren kennen. Het verschil zoude dan alleen in de hoeveelheid geproduceerd gas te vinden zijn, of m.a.w. in de sterkte der infectie met boterzuurfermenten.

Een in de praktijk al voor jaren toegepast middel tegen „knijpers” bestaat in het toevoegen van kleine hoeveelheden salpeter aan de melk. Reeds in 1829 werd door Jan Peereboom te Oosthuizen bij Edam de raad gegeven, ter bestrijding van het gebrek, wat zout in de wrongel te verwerken en bij de bereiding van het stremsel, dat destijds op de boerderij placht te geschieden, salpeter daaraan toe te voegen ²⁾.

We zien dus toen ter tijd al het gebruik van zout en salpeter aangewend, met dien verstande, dat de aan de melk toegevoegde hoeveelheid salpeter afhankelijk was van de gebruikte quantiteit lebaftreksel.

¹⁾ Zie deze verslagen 1912 No. XI over „Boekelscheuren” in kaas.

²⁾ Beschrijving en gebruik van middelen ten algemeenen nutte. Uitgegeven op last van de Nederlandsche Huishoudelijke Maatschappij te Haarlem. Uitgever Vincent Loosjes te Haarlem 1830.

In het „Handboek voor den Kaasmaker in Nederland” door Dr. P. J. Holleman, uitgegeven in 1877 ³⁾, vindt men eveneens salpeter opgegeven, doch met dit verschil, dat hier de directe toevoeging er van aan de melk wordt aangeraden. Daarnaast worden ook nog genoemd behalve zout, aluin en kaliumchloraat. Hoewel men toenmaals omtrent de oorzaak van het gebrek geheel in het duister tastte, en daarvoor verschillende verklaringen gaf, zooals het tochtig zijn der koeien, het weiden in etgroen, het eten van zekere planten, zoo blijkt wel, dat men het meende te kunnen bestrijden.

Toch schijnt het gebruik van salpeter zich niet in die mate ingeburgerd te hebben, als naar aanleiding van de mededeelingen daaromtrent zoude verwacht mogen worden. Waarschijnlijk is dit daarvan het gevolg geweest, dat men niet altijd op zekere resultaten kon wijzen. Zoo werd ons b.v. door den Zuivelconsulent voor Noordholland medegedeeld, dat het middel, in de gevallen waarin hij het toepaste, niet altijd voldaan had.

Met het oog op deze tegenstrijdige waarnemingen was het van belang na te gaan, of aan salpeter al dan niet de eigenschap moest worden toegeschreven het kwaad te kunnen beteugelen.

Daartoe zijn de volgende proeven genomen:

28 Mei 1912. Gemaakt van 50 L. mengmelk 2 Edammer kazen, gemerkt KNSI en KNI. Beide bevatten stremsel, en kleursel uit de praktijk, benevens zoogenaamde reincultuur (een mengsel van melkzuurfermenten) in eene hoeveelheid van 0,1 % der melk, en ieder ongeveer 4 c.c. van dezelfde reincultuur van een boterzuurferment in neutrale Löfflersche gelatine + $\frac{1}{2}$ % galactose, welke reincultuur 10 dagen oud is. Aan de melk waaruit KNSI gemaakt is, is nog bovendien 50 gram of 0,2 % kalisalpeter toegevoegd.

Als contrôle dient eene kaas, gemerkt C, welke uit dezelfde mengmelk gemaakt is op geheel gelijke wijze, behalve dat het boterzuurferment en de salpeter ontbreken.

Op 17 Juni 1912 worden de kazen opengesneden.

KNI is *een knijper* geworden.

KNSI is *geen knijper*, het deeg is bijna geheel gesloten, een enkel gaatje komt voor. De massa geeft nog eene sterke nitraat-, doch geen nitrietreactie.

C is bijna geheel gesloten, heeft een enkel boekelscheurtje.

29 Mei 1912. Gemaakt van 48 L. mengmelk 2 Edammer kaasjes, gemerkt KNS 2 en KN 3. Beide zijn bereid met stremsel, kleursel en 0,1 % reincultuur (melkzuurfermenten) uit de praktijk en bevatten ieder ongeveer 4 c.c. van eene 11 dagen oude reincultuur in gelatine van hetzelfde boterzuurferment. Bovendien is aan de melk voor KNS 2 50 gram of ongeveer 0,2 % kalisalpeter toegevoegd.

Van dezelfde mengmelk is eene contrôlekaas D gemaakt geheel

¹⁾ Bij Jan Schuitemaker en Co. te Amsterdam.

op dezelfde wijze, zonder toevoeging echter van salpeter en boterzuurferment.

Op 17 Juni worden de kazen opengesneden.

KN 3 is *een knijper* geworden.

KNS 2 is *geen knijper*, bevat nogal wat ronde gaatjes. De massa geeft nog eene sterke nitraat-, doch geen nitrietreactie.

D is geheel gesloten.

30 Mei 1912. Gemaakt van 48 L. mengmelk 2 kazen, gemerkt KNS 4 en KN 5. Beide bevatten stremsel, kleursel en 0,1 % reincultuur uit de praktijk, benevens ongeveer 4 c.c. van eene reincultuur van hetzelfde boterzuurferment in gelatine, 12 dagen oud, terwijl in de melk voor KNS 4 48 gram of 0,2 % kalisalpete is gedaan.

Eene derde kaas E, bereid op gelijke wijze uit dezelfde mengmelk zonder salpeter of boterzuurferment, dient als contrôlekaas. Op 24 Juni 1912 worden de kazen opengesneden.

KN 5 is *een knijper* geworden.

KNS 4 is *geen knijper*, de massa geeft nog eene sterke nitraatreactie.

E heeft enkele boekelscheurtjes.

31 Mei 1912. Gemaakt van 48 L. mengmelk 2 kazen, gemerkt KNS 6 en KN 7, op dezelfde wijze als de vorige. De gebruikte reincultuur in gelatine van het boterzuurferment is 13 dagen oud. Aan de melk voor KNS 6 is 48 gram = 0,2 % kalisalpete toegevoegd.

F is de contrôlekaas, bereid uit dezelfde mengmelk zonder boterzuurferment en salpeter.

Op 24 Juni 1912 worden de kazen opengesneden.

KN 7 is *een knijper* geworden.

KNS 6 is *geen knijper*; de massa geeft nog eene sterke nitraatreactie.

F is goed gesloten.

1 Juni 1912. Gemaakt van 48 L. mengmelk 2 kazen, gemerkt KNS 8 en KN 9, op gelijke wijze als de vorige. De gebruikte reincultuur van het boterzuurferment is 14 dagen oud. Aan de melk voor KNS 8 is 24 gram of 0,1 % kalisalpete toegevoegd.

K is de contrôlekaas, gemaakt als de andere contrôlekazen.

Op 24 Juni 1912 worden de kazen opengesneden.

KN 9 is *een knijper* geworden.

KNS 8 is *geen knijper*, de massa geeft nog eene duidelijke nitraatreactie.

K is mooi gesloten.

30 Juli 1912. Gemaakt van 50 L. mengmelk 2 kazen, gemerkt KNS en KN, op dezelfde wijze als de vorige. De gebruikte reincultuur in gelatine van het boterzuurferment is 11 dagen oud. De aan de melk voor KNS toegevoegde hoeveelheid kalisalpete is $12\frac{1}{2}$ gram = 0,05 %. De contrôlekaas wordt gemerkt A.

Op 28 Augustus 1912 worden de kazen opengesneden.

KN is een *knijper* geworden.

KNS is *geen knijper*, de massa geeft nog eene sterke nitraat-reactie.

A is mooi gesloten, heeft enkele boekelscheurtjes.

31 Juli 1912. Gemaakt van 50 L. melk 2 kazen, gemerkt KNSI en KN 2, op dezelfde wijze als de vorige. De gebruikte gelatinecultuur van het boterzuurferment is 12 dagen oud. De aan de melk voor KNSI toegevoegde hoeveelheid kalisalpeter is $12\frac{1}{2}$ gram = 0,05 %. B is de contrôlekaas uit dezelfde mengmelk op gelijke wijze gemaakt, zonder salpeter of boterzuurferment.

Op 12 November 1912, dus na ongeveer $3\frac{1}{2}$ maand worden de kazen opengesneden.

KN 2 is een *knijper* geworden.

KNSI is *geen knijper*, de massa geeft geen nitraatreactie meer.

B is goed.

1 Augustus 1912. Gemaakt van 50 L. mengmelk 2 kazen, gemerkt KNS 3 en KN 4, op dezelfde wijze als de vorige. De gebruikte reïncultuur in gelatine van het boterzuurferment is 13 dagen oud. Aan de melk, waaruit KNS 3 bereid is, werd 5 gram of 0,02 % kalisalpeter toegevoegd.

C is de contrôlekaas, uit dezelfde mengmelk op gelijke wijze bereid zonder salpeter of boterzuurferment.

Op 10 Augustus wordt KN 4 opengesneden, is een *knijper* geworden.

Op 28 Augustus worden de beide andere kazen doorgesneden.

KNS 3 is *geen knijper*, de massa vertoont eene zwakke nitraat-, doch geen nitrietreactie.

C is goed.

2 Augustus 1912. Gemaakt van 50 L. mengmelk 2 kazen, gemerkt KNS 5 en KN 6, op dezelfde wijze als vorige. De gebruikte reïncultuur in gelatine van het boterzuurferment is 14 dagen oud. Aan de melk voor KNS 5 is 5 gram of 0,02 % kalisalpeter toegevoegd.

D is eene contrôlekaas, uit dezelfde mengmelk op gelijke wijze gemaakt zonder salpeter of boterzuurferment.

Op 12 November 1912, dus na ongeveer $3\frac{1}{2}$ maand, worden alle kazen opengesneden.

KN 6 is een *knijper* geworden.

KNS 5 is *geen knijper*, de massa geeft geen nitraatreactie meer.

D is goed.

3 Augustus 1912. Gemaakt van 50 L. mengmelk 2 kazen, gemerkt KNS 7 en KN 8, op dezelfde wijze als de vorige.

De gebruikte reïncultuur in gelatine van het boterzuurferment is 15 dagen oud. Aan de melk voor KNS 7 werd $2\frac{1}{2}$ gram of 0,01 % kalisalpeter toegevoegd.

E is eene contrôlekaas, uit dezelfde mengmelk op gelijke wijze bereid zonder salpeter of boterzuurferment.

Op 28 Augustus worden alle 3 kazen opengesneden.

KN 8 is *een knijper* geworden.

KNS 7 is *geen knijper*, de massa vertoont geen nitraat- of nitrietreactie.

E is goed.

13 December 1912. Gemaakt van 48 L. mengmelk 2 kazen, gemerkt KN en KNS.

Beide kazen bevatten stromsel, kleursel en reïncultuur (0,1 %) van de praktijk en bovendien ieder 7 c.c. reïncultuur van een boterzuurferment in neutrale Löfflersche gelatine + $\frac{1}{2}$ % galactose, welke reïncultuur 6 dagen oud is.

Aan de melk voor KNS werd 12 gram kalisalpeteer of 0,05 % toegevoegd.

A is eene contrôlekaas, uit dezelfde mengmelk op gelijke wijze bereid zonder salpeter of boterzuurferment.

Op 9 Januari 1913 worden alle 3 kazen opengesneden.

KN is *een knijper* geworden.

KNS is *geen knijper*, salpeter is nog aanwezig.

A is goed.

14 December 1912. Gemaakt van 50 L. mengmelk 2 kazen, gemerkt KN 2 en KNS 3, op dezelfde wijze als de vorige. De gebruikte reïncultuur in gelatine van het boterzuurferment is 7 dagen oud.

Aan de melk voor KNS 3 is $12\frac{1}{2}$ gram kalisalpeteer toegevoegd of 0.05 %.

B is eene contrôlekaas, uit dezelfde mengmelk op gelijke wijze bereid zonder salpeter of boterzuurferment.

Op 31 December 1912 wordt KN 2 opengesneden en is deze *een knijper* geworden; de scheur is uitwendig te zien.

Op 6 Januari 1913 worden de beide andere kazen opengesneden.

KNS 3 is *geen knijper*, salpeter is nog aanwezig.

B is goed.

16 December 1912. Gemaakt van 50 L. mengmelk 2 kazen, gemerkt KN 4 en KNS 5, op dezelfde wijze als de vorige met dit verschil dat 3 c.c. reïncultuur in gelatine van het boterzuurferment is toegevoegd; deze cultuur is 9 dagen oud.

In de melk voor KNS 5 is $12\frac{1}{2}$ gram of 0,05 % kalisalpeteer gebracht.

C is eene contrôlekaas, op gelijke wijze uit dezelfde mengmelk bereid zonder boterzuurferment of salpeter.

Op 6 Januari 1913 worden alle 3 de kazen opengesneden.

KN 4 is *een knijper* geworden; de scheur is uitwendig te zien.

KNS 5 is *geen knijper* geworden, salpeter is nog aanwezig.

C is goed.

17 December 1912. Gemaakt van 50 L. mengmelk 2 kazen, gemerkt KN 6 en KNS 7, op dezelfde wijze als de vorige met dit verschil dat 4 c.c. gelatinecultuur van het boterzuurferment is toegevoegd, welke 10 dagen oud is.

In de melk voor KNS 7 is $12\frac{1}{2}$ gram of 0,05 % kalisalpeteer gedaan.

D is eene contrôlekaas, op gelijke wijze uit dezelfde mengmelk bereid zonder salpeter of boterzuurferment.

Op 2 Januari 1913 wordt KN 6 opengesneden; de kaas is een *knijper* geworden, de scheur is uitwendig te zien.

Op 6 Januari 1913 worden beide andere kazen doorgesneden.

KNS 7 is *geen knijper* geworden, salpeter is nog aanwezig.

D is goed.

18 December 1912. Gemaakt van 50 L. mengmelk 2 kazen, gemerkt KN 8 en KNS 9, op dezelfde wijze als de vorige, met dit verschil dat 1,75 c.c. gelatinecultuur van het boterzuurferment is toegevoegd, welke reïncultuur 11 dagen oud is.

In de melk voor KNS 9 is 5 gram of 0,02 % kalisalpeter gedaan.

E is eene contrôlekaas, op gelijke wijze uit dezelfde mengmelk bereid zonder salpeter of boterzuurferment.

Op 6 Januari 1913 worden alle 3 de kazen doorgesneden.

KN 8 is een *knijper* geworden, de scheur is uitwendig te zien.

KNS 9 is *geen knijper* geworden, salpeter is nog aanwezig.

E is goed.

In alle deze gevallen is dus bij de kazen geënt met het boterzuurferment, wanneer kalisalpeter was toegevoegd, het gebrek uitgebleven, terwijl als het kaliumnitraat ontbrak altijd een knijper ontstond.

Dat ook op den langen duur geene andere uitkomst wordt verkregen in dit opzicht, blijkt uit de kazen van 31 Juli 1912 en 2 Augustus 1912, welke nog na ongeveer 3½ maand eenzelfde resultaat gaven.

Waarom, ondanks de hier geconstateerde gunstige werking, in de praktijk soms geen invloed van salpeter te bespeuren valt, is wel te verklaren.

Bij de bovengenoemde proefkazen hebben wij te maken met eene infectie door het boterzuurferment alleen veroorzaakt; in de praktijk daarentegen is dit niet het geval. Daar vormen de boterzuurfermenten uit den aard der zaak slechts een onderdeel van de totale besmetting en nu hangt het af van de samenstelling der bacteriënflora van die besmetting, of de salpeter al dan niet zal kunnen ingrijpen.

Daar het gebrek eerst na ongeveer 10 à 14 dagen optreedt, moet de salpeter al dien tijd intact in de kaas voorkomen, zal ze op het goede tijdstip aanwezig kunnen zijn: wordt ze echter vóór dien tijd vernietigd, dan spreekt het vanzelf, dat dan de gunstige invloed er van uitblijft. Onder de bacteriën, welke in staat zijn salpeter aan te tasten, behoort, zooals bekend, de coli-commune, die de rijzing in kaas veroorzaakt, tegen welk gebrek eveneens het gebruik van kaliumnitraat wordt aangewend, zooals we in 1903 (Jaarverslag 1903 der Proefzuivelboerderij, blz. 79) mededeelden. Dit wordt spoedig door de bacterie geheel ontleed eerst tot nitriet, terwijl ook deze verbinding door verdere inwerking uiteenvalt.

Worden er dus naast boterzuurfermenten ook coli-commune in virulenten toestand door toevallige besmetting in de melk gebracht, dan zal de salpeter na korten tijd niet meer in de kaas voorkomen en is eene gunstige inwerking op de boterzuurfermenten buitengesloten. Op deze wijze kan verklaard worden, waarom het middel in de praktijk soms faalt. In die gevallen zoude eene verhoogde salpetergift, voor zoover doenlijk, nuttig kunnen zijn.

De vraag doet zich nu op, waaraan de gunstige werking van de salpeter is toe te schrijven. Het meest voor de hand liggend zoude zijn aan te nemen, dat men hier te doen heeft met een reductieverschijnsel of met eene giftwerking. Was het eerste het geval, dan zoude de ontwikkeling van koolzuur en waterstof het gevolg zijn van het zuurstofgebruik van het boterzuurferment. Men moet het zich dan zoo voorstellen, dat aan de melkzure kalk zuurstof onttrokken werd en deze bij het uiteenvallen CO_2 en H_2 levert. De salpeter biedt dan den bacteriën een losser gebonden zuurstofatoom dan de melkzure kalk, zoodat deze laatste intact blijft. Een analoog verschijnsel dus als bij de coli-commune plaats grijpt in hare verhouding tot de melksuiker.

Kolfjes echter met voormelde bouillon met 0,1 % of dikke kaaspap, waaraan 0,2 % KNO_3 was toegevoegd, leverden bij enting met het boterzuurferment na 14 en 17 dagen belangrijke hoeveelheden gas bestaande uit koolzuur, waterstof en stikstof, terwijl nog nitraat aanwezig was, doch nitriet ontbrak. Hieruit bleek dus, dat de salpeter noch gereduceerd werd, noch eene giftwerking uitoefende.

In overeenstemming met deze proeven was, dat van twee andere stoffen, welke evenals kalisalpeter gemakkelijk zuurstof afstaan, kaliumchloraat en kaliumnitriet, de eerste bij eene hoeveelheid van 0,1 % in bouillonkulturen evenmin de gasontwikkeling belette, terwijl de tweede bij een bedrag van 0,1 % den groei in bouillon tegenhield, dus giftwerking veroorzaakte.

Ook het vormen van koloniën, tenminste in de neutrale Löfflersche gelatine, gaat de kalisalpeter niet tegen. In dien voedingsbodem, waaraan 0,2 % KNO_3 was toegevoegd, ontstonden na 4 dagen koloniën en had gasontwikkeling plaats, terwijl, toen deze culturen 10 dagen oud waren, nog salpeter aan te toonen was, maar geen nitriet.

Evenmin als in de bouillon en gelatine treedt ook in de kazen geen nitriet op (zie die van 26 Mei 1912 en 29 Mei 1912), zoodat de salpeter daarin niet werkt indirect door vorming van eerstgenoemde voor de bacteriën schadelijke verbinding.

Uit een en ander volgt dus, dat de gunstige werking van kalisalpeter aan eene andere oorzaak moet toegeschreven worden. Misschien is deze daarin gelegen, dat het boterzuurferment zeer gevoelig is voor geringe hoeveelheden salpeterzuur, hetwelk uit onderstaande tabellen blijkt.

Op 11 Januari 1913 worden 6 buizen met neutrale Löfflersche

bouillon + $\frac{1}{2}$ % galactose met verschillende hoeveelheden HNO_3 geënt met het boterzuurferment.

c.c. $\frac{1}{10}$ n. HNO_3 per 10 c.c. bouillon.	Groei.
0,5	+ 20 Jan. 1913.
1	— 22 „ 1913.
1,5	— 22 „ 1913.
2	— 22 „ 1913.
2,5	— 22 „ 1913.
3	— 22 „ 1913.

Op 24 Januari 1913 worden 6 buizen met neutrale Löfflersche gelatine + $\frac{1}{2}$ % galactose met verschillende hoeveelheden HNO_3 geënt met het boterzuurferment.

c.c. $\frac{1}{10}$ n. HNO_3 per 10 c.c. bouillon.	Groei.
0,5	+ 31 Jan. 1913.
1	— 10 Febr. 1913.
1,5	— 10 „ 1913.
2	— 10 „ 1913.
2,5	— 10 „ 1913.
3	— 10 „ 1913.

Men ziet hieruit, dat de hoeveelheid salpeterzuur, noodig om in de bouillon of de gelatine den groei te beletten, gelegen is tusschen $\frac{1}{2}$ en 1 c.c. $\frac{1}{10}$ n. of 3,15 en 6,3 m.gr. per 10 c.c. en waar nu in kaas door omzetting met het melkzuur uit de salpeter sporen salpeterzuur gevormd kunnen worden, zoo is het niet onmogelijk, dat door die sporen salpeterzuur in het kaasdeeg vorming van koloniën onmogelijk wordt gemaakt.

Naast salpeter werd, zooals medegedeeld, o.a. ook kaliumchloraat als practisch middel ter bestrijding van het gebrek opgegeven en dit gaf ons aanleiding deze stof eveneens te beproeven.

19 December 1912. Gemaakt van 50 L. mengmelk 2 kazen, gemerkt KN 10 en KNC. Beide kazen bevatten stremsel, kleursel en reincultuur (0,1 %), alles zooals de praktijk ze gebruikt en bovendien ieder 2 c.c. van dezelfde reincultuur in neutrale Löfflersche gelatine + $\frac{1}{2}$ % galactose van het boterzuurferment, welke cultuur 12 dagen oud is.

Aan de melk voor KNC is $12\frac{1}{2}$ gram = 0,05 % kaliumchloraat toegevoegd:

F is eene contrôlekaas, op geheel gelijke wijze uit dezelfde mengmelk gemaakt, zonder KClO_3 of boterzuurferment.

Op 6 Januari 1913 worden alle 3 kazen opengesneden.

KN 10 is een *knijper* geworden, de scheur is uitwendig te zien.

KNC bevat in het hart van de kaas eene flinke kleine scheur $2\frac{1}{2}$ c.M. lang, naast boekelscheuren. De kaas is „knijperig”.

F is goed.

20 December 1912. Gemaakt van 50 L. mengmelk 2 kazen, gemerkt KN 11 en KNC 2, geheel op dezelfde wijze als de vorige. De gebruikte reïncultuur van het boterzuurferment is 13 dagen oud.

Aan de melk voor KNC 2 is 5 gram = 0,02 % kaliumchloraat toegevoegd.

H is eene contrôlekaas, uit dezelfde mengmelk op geheel gelijke wijze gemaakt zonder gebruik van $KClO_3$ of boterzuurferment.

Op 3 Januari 1913 wordt KNC 2 opengesneden. De kaas is een *flinke knijper* geworden. Door het midden gaat eene breede scheur, welke aan beide einden tot de korst doorloopt en daar uitwendig te zien is.

Op 6 Januari 1913 worden de beide andere kazen doorgesneden.

KN 11 is een *flinke knijper* geworden. Eene dwarse scheur loopt midden door de kaasmassa en eindigt aan een kant onder de korst, aan het andere einde op een afstand van ongeveer 2 c.M. van de korst.

H is goed.

Uit deze proeven blijkt, dat eene hoeveelheid van 0,02 % $KClO_3$ niet den minsten invloed uitoefent, doch dat zelfs 0,05 % daarvan nog niet genoeg is om het gebrek geheel en al te onderdrukken, zoodat dit middel, wat de uitwerking betreft, verre ten achter staat bij kalisalpeteer, waarvan 0,01 % reeds voldoende bleek.

Zooals reeds in eene noot (bldz. 15) medegedeeld is, hebben „knijpers” eene meer of minder weeke kern, welke op het gezicht en door een licht drukken met de vingers gemakkelijk te onderscheiden is van het omringend minder plastisch gedeelte.

Dit verschijnsel staat in verband met het gedrag van het boterzuurferment ten opzichte van het keukenzout, waarvan onderstaande tabel aanwijzing geeft.

Op 24 Januari 1913 worden 4 buisjes met neutrale Löfflersche bouillon + $\frac{1}{2}$ % galactose met verschillend zoutgehalte geënt.

NaCl in de bouillon.	Datum van optreden van groei.
2 %	+ 31 Jan. 1913
$2\frac{1}{2}$ %	+ 31 „ 1913
3 %	+ 31 „ 1913
$3\frac{1}{2}$ %	+ 4 Febr. 1913
4 %	— 10 „ 1913

(In de vloeistof met $3\frac{1}{2}$ % NaCl zijn evolutievormen te zien en komen clostridiën met sporen voor.)

Uit deze proef volgt dus dat een zoutgehalte van 4 % den groei tegenhoudt. Gaan we aan de hand van het vroeger gegeven lijstje het zoutgehalte van eene kaas na (zie verslag der Proefzuivelboerderij 1904, blz. 77).

Kaas versch uit de pekel	Droge stof.	Na Cl omgerekend op het vochtgehalte.
Buitenste laag	61,6 %	13,3 %
Middenlaag	54,0 %	4,0 %
Binnenste laag	52,0 %	0,4 %

dan blijkt, dat reeds na het pekelen een groot deel er van een hooger gehalte heeft dan 4 %. Aangezien het zout van af de buitenste laag meer en meer naar binnen dringt, al naarmate de kaas ouder wordt en de bacterie ongeveer 12 tot 14 dagen noodig heeft om daarin tot goede ontwikkeling te komen, zoo zal er slechts een centraal gedeelte der kaas overblijven, waar het zoutgehalte van dien aard is, dat dit geen beletsel wordt voor den groei. Daar de bacterie de kaasstof aantast, zoo ligt het voor de hand dat de kern der kaas dus in een weekeren, plastischer toestand zal komen dan het overige gedeelte. In welk eene mate dit het geval zal zijn is, zooals van zelf spreekt, afhankelijk van de intensiteit der inwerking van het micro-organisme.

Met het oog op de eigenschap van het boterzuurferment in de paracaseïne chemische veranderingen teweeg te kunnen brengen, was het wenschelijk na te gaan, of deze van dien aard waren, dat van eene rijping der kaas gesproken zoude kunnen worden. Zooals bekend, schrijven sommige onderzoekers dit verschijnsel aan boterzuurfermenten toe.

De kazen uit aseptisch gemolken melk bereid op 12 April, 17 April, 24 April, 1 Mei, 8 Mei en 17 Mei 1912 waren voor dit doel gemaakt.

Die van 12 April 1912 werd reeds op 25 April opengesneden, zoodat deze buiten beschouwing kan blijven, aangezien een tijdsverloop van 13 dagen te kort is dan dat noemenswaardige veranderingen zouden kunnen optreden. De overige zijn onderzocht op smaak en reuk toen ze 3 maanden of iets ouder waren, behalve die van 17 Mei, welke goed 2 maanden oud was. Omtrent deze kazen is reeds de bereidingswijze en het resultaat wat de knijpervorming aangaat medegedeeld, en volgt daarom hieronder alleen de opgave ten opzichte van reuk en smaak.

Kazen van 17 April 1912, opengesneden 22 Juli 1912. P.R: smaak zoetachtig kazig, herinnert aan die van Emmenthaler, reuk kaasachtig, iets naar boterzuur. Deeg plastisch. C: weinig reuk of smaak.

Kazen van 24 April 1912, opengesneden 22 Juli 1912. P.R: smaak zoetachtig kazig, lijkt op die van Emmenthaler, reuk kazig, iets naar boterzuur. Deeg plastisch. C: weinig reuk of smaak.

Kazen van 1 Mei 1912, opengesneden 1 Augustus 1912. R.P: smaak zoetachtig kazig, herinnert aan die van Emmenthaler, reuk kaasachtig, iets naar boterzuur. Deeg plastisch. C: smaak zuur, reuk zuur. Deeg kort.

Kaas van 8 Mei 1912, opengesneden 23 Augustus 1912. P.R.: smaak zoetachtig kazig, herinnert aan die van Emmenthaler, reuk kaasachtig. Deeg plastisch. C: weinig reuk of smaak.

Kazen van 17 Mei 1912, opengesneden 22 Juli 1912. P.R.: smaak zoetachtig kazig, herinnert aan die van Emmenthaler, reuk kaasachtig. Deeg plastisch. C: weinig reuk of smaak.

Al deze kazen hadden dus een smaak welke zoetachtig kazig was en een op kaas gelijkende geur; van eene echte Edammer kaasrijping was echter geen sprake. Het feit trouwens, dat in Edammer kaas dergelijke boterzuurfermenten weinig of niet voorkomen, zooals bleek, en voorstaande kazen allen knijpers zijn geworden, elimineert eenigen invloed van beteekenis van deze micro-organismen op de normale Edammer kaasrijping.

PLAATVERKLARING.

Boterzuurferment (fig. 1) gekweekt in neutrale Löfflersche gelatine met $\frac{1}{2}$ % galactose, behandeld met Jodiumtinctuur.

De sporen bevinden zich aan de uiteinden der bacteriën, terwijl de donkere gedeelten de donkerbruine plekken zijn, welke door het Jodium ontstaan zijn. Vergrooting 1000 maal.

Knijper (fig. 2).

Photo van den experimenteelen knijper van 22 Februari 1912, gemerkt K N M 4, welke 4 Maart 1912 doorgesneden is.

Knijper (fig. 3).

Photo van een knijper uit de practijk.

Ueber den Käsefehler „Knijper“.

(Kurze Zusammenfassung obiger Ausführungen.)

Der Edamer Käsefehler „Knijper“ ist gekennzeichnet durch das Auftreten eines oder mehrerer Risse, welche den Käseteig durchsetzen und sozusagen den Käse in besonderen Teilen trennt. In den schlimmsten Fällen setzen die Risse sich fort bis zum äussersten Rande und wird die Kruste stellenweise zerrissen. Der Fehler zeigt sich 12 bis 14 Tage nach der Herstellung des Käses und wird entdeckt durch den hohlen Klang beim Klopfen und durch die Bildung einer anfangs kleinen, untiefen Rinne in der Kurste an der Stelle wo der Riss die Käsoberfläche nähert.

Die Risse entstehen durch Gasbildung im Innern der Käsemasse. Das Gas wurde durch zerschneiden der Knijper-Käsen unter Wasser aufgefangen in einem groszen Glastrichter, welcher mit Wasser gefüllt umgekehrt über dem Käse gestülpt war, und am Rohrende durch einen Kaoutschuckschlauch mit Quetschhahne abgeschlossen war. Das Gas von 6 „Knijpers“ aus der Praxis enthielt immer Kohlensäure, Wasserstoff und Stickstoff in verschiedenen Verhältnissen gemischt.

Es wurde untersucht inwiefern die Bildung der „Knijpers“ abhängig ist von der Plasticität des Käseteiges; als Maszstab für die Plasticität diente die Menge N welcher in 1 Gram. Käsemasse unlöslich blieb nach Anreiben und Schütteln mit 100 c.M³. einer 5 % Kochsalzlösung; die starke Bindung von Paracaseine und Milchsäure, welche die Ursache des kreidigen Zustandes im Käse ist, bleibt darin ungelöst. Von 9 Käsen mit dem betreffenden Fehler enthielten 7 bedeutende Mengen unlöslichen Käsestoff; während 2 dieselbe Menge wie normaler Käse zeigten; ein bestimmtes Verhältnis zwischen Gasbildung und Plasticität giebt es also nicht, obgleich die Geschmeidigkeit meistens geringer ist wie bei normalem Käse.

Die Zusammensetzung des Gases und dessen späte Bildung im Käse, welches ein Angreifen des Milchzuckers ausschloss, deutete auf eine Art Buttersäuregährung hin, welche milchsäures Kalzium und Käsestoff als Kohlenstoffquelle und Stickstoffquelle verwenden muss. Zur Isolirung der Bacterie wurden die anderen Arten durch Erhitzung ausgeschlossen, nachdem vorher vergebens Reinzüchtung versucht war. Als Nährmedium verwendeten wir Löfflersche Bouillon mit $\frac{1}{2}$ % Galactose. Es wurde cultivirt in Glasröhrchen, welche luftleer gepumpt und zugeschmolzen waren; darauf folgte eine Erhitzung zur Tötung der Bacteriën, sodass nur die Sporen am Leben blieben.

In dieser Weise gelang es immer aus „Knijpers“ ein bewegliches Buttersäureferment zu cultiviren; normaler Edamer Käse enthält nach unseren Versuchen nie Buttersäurefermente in einer Quantität dass sie in dieser Weise isolirt werden können. Die Rein-

culturen dieses Buttersäurefermentes zeigen Gasbildung, gleichfalls aus Kohlensäure, Wasserstoff und Stickstoff bestehend. Ein anderer geeigneter Nährboden ist Käsebrühe hergestellt aus 5—14 Tage altem, gemahlenen und mit Wasser angeriebenen Käse, welcher dieselbe Gasbildung liefert. In beiden Nährböden entstehen bedeutende Mengen Buttersäure.

Die Stabförmigen Bakterien haben die folgenden Dimensionen $3,75 \times 1,65 \mu$ und bilden wachsähnliche Kolonien bei anaerobem Wachstum in Gelatine der obengenannten Bouillon. Beweglichkeit tritt in 6 Tage alten Bouillon-culturen auf, wenn pro 10 c.c., $\frac{1}{2}$ c.c., $\frac{1}{10}$ normal Milchsäure zugesetzt ist. Die Sporen entstehen sehr zahlreich in Gelatine-Kulturen; weniger in Bouillon. Ihre Tötung erfolgt erst durch 10 Minute lange Erhitzung auf $85,5-88^{\circ}$ C. Gegen Milchsäure sind die „Knijpers“-bakterien in ziemlich starkem Grade resistent; sie sind weiter streng anaerob.

Mit Kulturen dieses Buttersäurefermentes wurde in Milch, welche übrigens vorzüglichen Käse lieferte, nach genau derselben Bereitungsweise „Knijpers“ hergestellt; die Gelatinekulturen lieferten immer den gewünschten Erfolg; Bouillon-Kulturen dagegen schlugen einige Male fehl; wahrscheinlich durch weniger starken Virulenz dieser Kulturen. Die in jener Weise geimpften 12 Käsen wurden alle „Knijpers“, die Controll-Käsen blieben geschlossen. Das Gas aus diesen „Kunstknijpers“ bestand gleichfalls aus Kohlensäure, Wasserstoff und Stickstoff. Es konnte also geschlossen werden dass „*Knijpers*“ entstehen durch *Infection der Milch mit virulenten Buttersäure-bakterien*.

Die starke Verbreitung dieser Bakterien wurde u. a. nachgewiesen durch ihre Isolirung aus Kuhfaeces. Die also erhaltenen Bakterien zeigten dieselben morphologischen und physiologischen Eigenschaften. Käsen aus gewöhnlicher Mischmilch, welche mit einer Kultur dieser Bakterien geimpft wurden, lieferten immer „Knijpers“, welche die drei erwähnten Gase enthielten.

Eine Eigentümlichkeit der „Knijpers“, n.l. dass die Risse meistens vertical liegen, wurde näher untersucht und es stellte sich heraus, dass auch bei anderer Hinstellung der Käsen wie gewöhnlich, z. B. auf der Seitenfläche die Risse fast immer eine verticale Richtung annehmen. Die Erklärung ist also, dass das Gas die Käsemasse nach der Seite wegdrückt, wo der geringste Widerstand herrscht, also in einer homogenen Masse so, dass möglichst wenig Käsemasse gehoben wird, was bei ein verticaler Riss der Fall ist.

Ein von alters her in Holland bekanntes Mittel zur Bekämpfung der „Knijpers“ besteht in der Anwendung von Kalisalpeter. Anfänglich wurde empfohlen dieser bei der Bereitung des Labes, wie sie früher immer auf dem Hofe geschah, anzuwenden. Später findet man den Rat den Salpeter an die Milch selber zuzusetzen. Die Verwendung dieses Mittels scheint aber nicht allgemein eingebürgert; teilweise wahrscheinlich, weil es nicht immer Abhülfe geben soll. Die Wirkung des Salpeters ist in 15 verschiedenen

Versuchen untersucht worden und es stellte sich dabei heraus, dass in allen Fällen, wo der Kalisalpeter zugesetzt wurde, der Fehler ausblieb, trotz der Anwesenheit des Buttersäurefermentes, während die Käsen ohne Salpeter immer „Knijpers“ wurden. Eine Menge von 0,01 % Kalisalpeter an die Milch zugesetzt, reichte schon aus. Dass trotzdem dieses Mittel in der Praxis bisweilen fehlschlägt, hat wahrscheinlich seinen Grund in starken Nebeninfectionen der Milch z. B. mit *Coli-commune*, welcher den Salpeter vollständig reducirt bevor das Buttersäureferment davon beeinflusst werden kann.

Welchen Einfluss übt der Salpeter auf die Entwicklung der Buttersäurebacterien aus? Man konnte dabei denken an Reductionserscheinungen und an Giftwirkung. Im ersten Falle würde die Bacterie den locker gebundenen Sauerstoff in Kalisalpeter ziehen vor den Sauerstoff in Milchsauerm Kalzium, welcher Substanz beim auseinander fallen Kohlensäure und Wasserstoff liefern würde.

Kulturen des Buttersäurefermentes in Bouillon und Gelatine, welche beide Salpeterhaltig gemacht wurden, zeigten Gasbildung, während die Salpeterreaction im starken Grade bestehen blieb. Auch in Käsen mit Kalisalpeter findet man noch immer eine deutliche Salpeterreaction. Die Wirkung des Salpeters ist also nicht als Sauerstoffquelle und ebensowenig direct giftig. Vielleicht liegt der günstige Erfolg bei „Knijpers“ in der Bildung kleiner Mengen Salpetersäure, weil das Buttersäureferment sich sehr empfindlich dieser Säure gegenüber zeigte und die Entstehung geringer Quantitäten in der Käse nicht ausgeschlossen ist durch die Milchsäureproduction.

Zur Bekämpfung der „Knijpers“ wird auch Kaliumchlorat empfohlen, weshalb gleichfalls einige Versuche hiermit angesetzt wurden. In zwei Versuchen zeigte sich dass 0,05 % Kaliumchlorat nicht genügte zum Unterdrücken der Gasbildung im Käse mit Buttersäureferment.

Die Eigenschaft der meisten „Knijpers“ dass der Kern des Käses bedeutend weicher ist, wie der Randteil wurde näher studirt durch Untersuchung welchen Einfluss das Salzen auf die Entwicklung des Buttersäurefermentes ausübt. Eine 4 % Kochsalzlösung genügte schon zur Hemmung jedes Wachstums in Bouillonkulturen. Das Salzen der Edamer Käsen geschieht von aussen her durch Salzauflegen und Pöckeln, und weil das Salz ziemlich schnell vom Rande aus in die Käsemasse eindringt, so bleibt 12—14 Tage nach der Bereitung nur ein kleiner centraler Teil übrig, wo der Salzgehalt unter 4 % liegt und wo die Buttersäurebacterien sich also vermehren können. Weil diese Bacterien den Käsestoff angreifen, ist es selbstverständlich dass der innere Teil weicher anföhlt wie der Uebrige des Käses.

Mit Rücksicht auf die chemischen Aenderungen welche das Buttersäureferment in Paracaseine hervorruft, war es erwünscht der eventuelle Anteil dieser Bacterie bei der Käsereifung zu

prüfen. Deshalb wurden die 4 Käse aus aseptisch gemolkener Milch mit Zusatz von „Reinkulturen“ und Buttersäureferment hergestellt, auf Käsegeschmack untersucht. In keinem Falle wurde aber der richtige Käsegeruch und -geschmack constatirt, sodass diesen Bacterien keinen Anteil bei der Reifung des Edamer Käses zugeschrieben werden kann. Dies geht übrigens schon aus der Tatsache hervor, dass in normalem Edamer Käse derartige Buttersäurefermente wenig oder gar nicht vorkommen.
